TOYOPEARL®

アフィニティクロマト用色素保持担体

TOYOPEARL AF-Blue HC-650M

取扱説明書

ご使用の前に

¡本製品を使用する前に，必ずこの取扱説明書をよく読んで理解してください.
¡この取扱説明書は，手近な所に大切に保管し，必要なときにいつでも取り出せるようにしてください.
¡製品本来の使用方法および取扱説明書で指定した使用方法を守ってください.
¡本書の安全に関する指示に対しては，指示内容を理解の上，必ず従ってください.
以上の指示を必ず厳守してください.
指示に従わないと，けがや事故の恐れがあります.

【取扱説明書について】

¡取扱説明書の内容は，製品の性能・機能の向上により将来予告なしに変更することがあります.
¡取扱説明書の全部または一部を無断で転載，複製することは禁止しています.
¡取扱説明書を紛失したときは，巻末の連絡先までお問い合わせください.
¡取扱説明書の内容に関しては万全を期していますが，万一不審な点や誤り，記載漏れに気づいたときは，お手数ですが巻末の連絡先までご連絡ください.

安全上のご注意

- ご使用の前に，この「安全上のご注意」をよくお読みのうえ，正しくお使いください.
- この項目は，いずれも安全に関する内容ですので，必ず守ってください.
- 「警告」「注意」の意味は次のようになっています.

⚠ 警告	取扱を誤った場合，使用者が死亡または重傷を負う可能性が想定されるもの.
⚠ 注意	取扱を誤った場合，使用者が傷害を負う可能性が想定されるものまたは物的損害の発生が想定されるもの.

ご使用時

● 火気厳禁

- 引火性のある溶媒を使用する場合，火気の使用は厳禁です．火災，爆発の原因になります.

● 換気に注意を

- 引火性，毒性のある溶媒を使用する場合，充分換気をしないと火災，爆発，中毒の原因になります.

● 液漏れに注意を

- 溶媒等の液漏れは，感電，中毒，薬傷，火災，腐食などの原因になります．液漏れの場合は，適切な保護具を付けた上で，液を取り除いてください.

⚠ 注意

●保護具の着用を

- 有機溶媒や酸などの溶離液を取扱う場合は，保護メガネ，手袋などの保護具をご使用ください．薬傷を負う恐れがあります．

●容器の取扱いに注意を

- 保存温度および取扱いが不適切であると，容器が破裂，破損する可能性があります．取扱いには充分注意してください．

●適切な使用方法を

- 本バルクゲルは分離，精製等に用いるもので，それ以外の目的には使用しないでください．

●圧力に注意を

- 送液ポンプ等により，本バルクゲルをカラムに充填または充填し測定する場合，過度な圧力は充分な性能が得られない場合やカラムの破裂，ゲルの飛散等の可能性があります．本バルクゲルの取扱説明書に記載された規定以上の圧力にならぬように注意ください．適切な保護具を付けた上で，充分注意して作業を行ってください．

●分離精製物の取扱いに注意を

- 得られた分離精製物または精製溶液を製品及び中間体として使用する場合は，充分にその安全性の確認を行ってご使用ください．

●処分には適切な処理を

- 廃棄する場合は，産業廃棄物として適切な処理を行ってください．
- 購入時の容器が不要になった場合は，溶媒が残らないように処置・洗浄をし，種類別に適切な処分を行ってください．

色素保持担体AF-Blue　HC-650Mをお買い求めいただき，ありがとうございます．

この取扱説明書をご覧いただき，TOYOPEARLの優れた性能を充分に生かしてご使用くださいますよう，お願い申し上げます．

目　次

2001年11月作成

1. はじめに

TOYOPEARL AF-Blue HC-650MはTOYOPEARL HW-65に色素Cibacron Blue 3GAを共有結合させたNADP依存性酵素（脱水素酵素，還元酵素，リン酸化酵素など）や血清成分（血清アルブミン，血液凝固因子など）の分離・精製に適した分離能の良い群特異的アフィニティクロマトグラフィ用ゲルです．

TOYOPEARL AF-Blue HC-650MはHSA吸着容量が18mg/ml-gel以上であり，色素の漏れ出しが非常に少ない特長を持っています．

少量からラージスケールのタンパク質精製まで幅広くご使用いただけます．

2. 操作法

2.1 微粒子の除去

ゲルには若干の微粒子が含まれています．特に多量のゲルをご使用になる場合，目詰まりの原因となることも考えられます．ゲルの4倍程度の蒸留水で攪拌，静置し，微粒子を含む上澄液を捨ててください．この操作を3～5回繰り返します．

2.2 スラリーの調製，カラム充てん

デカンテーションで微粒子を除去したゲルを，充てん溶媒で洗浄します．洗浄後スラリー濃度が30～50%になるように充てん溶媒を加えてスラリー化しカラムに充てんします．

充てんは他のトヨパールと同じように加圧（0.05～0.2MPa）下でおこないます．この場合はポンプ（HPLC用ポンプ，ペリスタリックポンプ）とリザーバーが必要です．簡便法である自然落差充てん法は，従来からアフィニティクロマトでよく使用されていますが，水圧を大きくとっていただく方が性能の良いカラムが得られます．

2.3 使用前の洗浄

ゲルをカラムに詰めた後，新品のゲルの場合でも1mol/L NaClまたは1mol/L KCl溶液で洗浄します．一度使われたゲルで，より強い洗浄を必要とする場合2mol/L KCl溶液または4mol/L尿素溶液で洗浄してください．

次に使用する緩衝液で平衡化します．

2.4 平衡化

カラムの平衡化に用いる緩衝液には，NaClなどの塩を含まない溶液（例えば塩

濃度0.05mol/L以下）を使用します．カラム平衡化のため，カラム容積の3倍量ないし5倍量の緩衝液を流します．

2.5　試料の添加および吸着

試料は初期緩衝液に溶かします．試料が塩などを含む場合は，透析や希釈により塩濃度を0.1mol/L以下にしてからカラムに添加します．試料がうまくカラムに吸着しない場合，以下の処理をおこなうと吸着することがあります．

1. 流速を下げる．
2. 緩衝液のpHを下げる．
3. 金属イオン（10mmol/L $MgCl_2$など）を含む緩衝液を使用する．
4. EDTAやメルカプトエタノールを含む緩衝液を使用する．

2.6　溶　出

試料添加後，カラム容量の約5倍量の初期緩衝液で充分カラムを洗浄し，吸着しない夾雑タンパク質を除きます．

アフィニティクロマトグラフィーでの溶出法は，大きく分けて非特異的溶出法と特異的溶出法の2種類があります．

非特異的溶出法および特異的溶出法の実用上の特徴を表1に示します．

表1　溶出方法とその実用上の特徴

溶出法	溶出の様式	精製度	回収率	操作性	経済性
非特異的	ステップグラジエント	○	○	◎	◎
	リニアグラジエント	◎	○	△	◎
特異的	ステップグラジエント	◎	◎	◎	△

非特異的溶出法では，緩衝液中の塩濃度を高める方法が一般的で，通常2mol/L KClまたは3mol/L NaClでタンパク質が溶出されます．それでも溶出しない場合は表2のような溶出液が使用できます．特異的溶出方法とは，酵素に対する基質や補酵素などを用いる方法です．
通常10mmol/L以下の溶液で溶出がおこなえます．

表２　使用できる溶出液

2mol/L	塩化カリウム
3mol/L	塩化ナトリウム
4mol/L	尿素
4.2mol/L	硫酸アンモニウム（飽和）
1mol/L	チオシアン酸ナトリウム
0.1mol/L	水酸化ナトリウム
1%	トリトンX-100
75%	エチレングリコール
50%-50%	クロロホルムーメタノール

（注）アルブミンの精製や除去では，通常0.1mol/Lリン酸緩衝液（pH7）で吸着させ，3mol/L NaClを含む援衝液で溶出します．
　この場合溶出液にはそのほか4mol/L尿素，0.3mol/Lチオシアン酸ナトリウムも使用できます．

2.7　洗浄，再生

目的のタンパク質が溶出した後でも，まだ夾雑蛋白質等が吸着していることがありますから，最後に必ず2mol/L KClまたは3mol/L NaClで洗浄してください．

3. 保　存

ゲルは1mol/L NaCl（KCl）存在下，20%エタノールを含む中性溶液で低温（２～８℃）で保存してください．

4. 応　用

4.1　ネガティブアフィニティクロマトグラフィ（夾雑物の除去に適用）

アフィニティクロマトグラフィでは，目的のタンパク質をカラムに吸着させ，夾雑物を素通りさせて除く方法が一般的です．しかし目的のタンパク質がカラムに吸着しなくても，逆に夾雑物をカラムに吸着させることにより分離・精製することもできます．例えば血清中の微量成分の分離・精製では，まず血清中に大量に存在するアルブミンをTOYOPEARL AF-Blue HC-650Mに吸着させることにより除くことができ，カラムを素通りする微量成分は次の精製ステップが容易になります．

以下の名称は東ソー株式会社の登録商標です.

HLC, TSK-GEL, TSKgel, TSKgel SuperMultipore,
BioAssist, Enantio, PStQuick,
エンバイロパック/Enviropak, トヨパール/TOYOPEARL, ToyoScreen,
TOYOPEARL GigaCap, トヨパールメガキャップ/TOYOPEARL MegaCap,
トヨパールパック/TOYOPEARLPAK, TOYOPAK

東ソー株式会社　バイオサイエンス事業部

東京本社	営業部	☎(03)5427-5180	〒105-8623	東京都港区芝3-8-2
大阪支店	バイオサイエンスG	☎(06)6209-1948	〒541-0043	大阪市中央区高麗橋4-4-9
名古屋支店	バイオサイエンスG	☎(052)211-5730	〒460-0003	名古屋市中区錦1-17-13
カスタマーサポートセンター		☎(0120)17-1200	〒252-1123	神奈川県綾瀬市早川2743-1

Printed in Japan